

Polysaccharide Degrading Enzyme를 이용한 참모자반 효소분해 추출물의 생리활성 연구

조은경[†], 강수희[†], 최영주*

Biological Analysis of Enzymatic Extracts from *Sargassum fulvellum* Using Polysaccharide Degrading Enzyme

Eun Kyung Cho[†], Su Hee Kang[†], and Young Ju Choi*

접수: 2013년 8월 7일 / 게재승인: 2013년 11월 18일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: SC092 strain, producing a polysaccharide degrading enzyme, was isolated from the seawater. This strain was identified as *Microbulbifer* sp. using the comparative sequence analysis against known 16S rRNA sequence. A polysaccharide degrading enzyme from this strain was used to acquire the enzymatic extracts of *Sargassum fulvellum*. DPPH radical scavenging and SOD activity of the enzyme extracts of *S. fulvellum* were about 61.9% and 82.9% at 2 mg/mL, respectively. Nitrite scavenging activities was 52.5% at 2 mg/mL on pH 1.2. In addition, α -glucosidase inhibitory activity was also increased in a dose-dependent manner and was about 52.7% at 2 mg/mL. To determine the influence of enzyme extracts of *S. fulvellum* on alcohol metabolism, the generating activity of reduced-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) by alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) were measured. ADH and ALDH activities were 118.0% and 177% at 2 mg/mL, respectively. α -glucosidase inhibitory activity of enzyme extracts of *S. fulvellum* was remarkably increased in a dose-dependent manner and was about 52.7% at 2 mg/mL. These results indicate alcoholizing and α -glucosidase inhibitory activities can be enhanced by the enzymatic extracts of *S. fulvellum*.

Keywords: *Sargassum fulvellum*, Antioxidant activity, Enzyme extract, α -glucosidase, Alcohol dehydrogenase

1. 서론

해조류는 식용, 약용 및 산업용 소재 등으로 다양하게 이용되어 왔으며, 해조류의 중요한 기능성 소재들은 우리들이 식용하는 다시마, 미역, 모자반 및 감태등과 같은 해조류에 함유되어있는 alginic acid, carrageenan, agar, fucoidan 및 laminarin 등과 같은 비소화성 다당류인 것으로 보고되고 있다[1].

최근 해조류가 웰빙 식품으로 관심이 높아지면서 해조류의 기능성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 특히 특수한 환경에서 성장하는 해조류로부터 약리작용이 있는 신물질을 찾으려는 관심이 높아지면서 해조류의 생리활성에 대한 연구뿐만 아니라 유효성분을 추출하여 nutraceuticals, 화장품 및 의약품으로 개발하고자 하는 연구도 집중되고 있다 [2-5]. 또한 해조다당류로부터 바이오 에탄올 생산을 위한 소재로 활용하기 위한 연구도 활발하게 진행되고 있다 [6-8].

우리나라에는 약 20여종의 모자반 (*Sargassum*)이 분포하고 있으며, 그 중 식용으로 이용되는 대표적인 모자반은 흔히 '참물' 또는 '참모자반'으로 중요한 탄수화물은 cellulose, fucoidan, laminaran, alginic acid 등의 복합다당류가 36~60% 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 [7].

모자반에 대한 생리활성연구는 유기용매 추출을 통한 항균 실험과 열 및 pH 안정성에 대한 연구 [5], 모자반 fucoidan의 항혈액응고에 대한 연구 [9], 항산화 특성에 대한 연구 [10],

신라대학교 식품영양학과
Department of Food and Nutrition, College of Medicinal Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
Tel: +82-51-999-5459, Fax: +82-51-999-5457
e-mail: yjchoi@silla.ac.kr

[†]These authors have contributed equally to this work.

Hwang 등 [11]의 복합다당류의 면역기능에 효과 및 plastoquinone 화합물들이 항산화 및 항당뇨 효능에 대한 연구 [12,13] 등이 알려져 있다.

해조류에 대한 대부분의 연구들은 유기 용매 추출과 열수 추출을 이용한 것으로 우수한 항산화 효과를 나타내는 반면에 추출 수율이 낮고 열에 의한 항산화 성분 파괴와 인체 독성 등에 문제점이 야기되고 있다 [14,15]. 이러한 문제점을 극복하기 위해 기존의 유기용매 추출법이 아닌 새로운 추출법으로 효소적 가수분해방법을 적용하여 해조류에 함유되어 있는 유효성분을 추출하여 생리활성을 분석하고자 하는 연구가 수행되고 있다 [16,17]. 그런데 기존의 이러한 효소적 가수분해방법들은 상용화된 정제 효소를 이용하여 단백질 또는 당 분해산물을 제조하여 가수분해 산물의 생리활성 연구 [15,18]를 수행하고 있지만 산업에 응용하기 위해서는 경제적인 문제 등 어려움이 많다.

본 연구에서는 해양으로부터 분리된 *Microbulbifer* sp. [19] 균주에서 생산되는 polysaccharide degrading 효소를 이용하여 비소화성 다당류의 저분자화산물을 산업적으로 이용할 수 있는 가능성을 연구하고자 참모자반의 효소가수분해 추출물의 생리활성을 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료조제

본 실험에 사용한 참모자반 (*S. fulvellum*)은 제주산 건 모자반을 구입하여 세척, 건조 후 warning blender로 분쇄한 다음 150 μ m 체에 걸러내어 효소추출을 위한 재료로 사용하였다.

2.2. 균주 및 조효소 조제

조효소 조제에 이용된 균주는 본 실험실에서 분리한 *Microbulbifer* sp. SC092 균주 [19]로 alginic acid, agar 및 laminarin을 분해하는 효소의 활성이 매우 높은 균주를 사용하였다. 조효소 조제를 위한 균주 배양은 0.3% agar가 함유된 marine broth 배지에서 37°C, 72시간 진탕배양 (180 rpm)하였다. 배양액을 6,000 \times g에서 30분간 원심분리를 하여 균체를 제거하고 상등액을 조효소액으로 하였다. 조효소 조제는 상등액에 30% ammonium sulfate로 포화시켜 4°C에서 24시간 침전한 후 8,000 \times g에서 30분간 원심분리를 하였다. 상등액을 다시 70%의 ammonium sulfate로 포화시켜 4°C에서 24시간 방치시킨 다음 10,000 \times g에서 30분간 원심분리를 하였다. 침전물을 TE buffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0)에 녹여서 투석을 한 후 조효소로 사용하였다. 조효소의 함량은 Bradford의 방법 [20]에 따라 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준단백질은 Bovine serum albumin을 사용하였다.

2.3. 조효소활성 측정

조효소 활성은 1% Bacto-agar를 함유한 TE buffer에 조효소액을 반응시켜 생성된 galactose 함량을 DNS법 [21]으로 환

원당을 측정하였다. 효소반응은 기질용액 1 mL에 조효소액 0.5 mL을 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분간 1 μ M의 galactose를 생산하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

2.4. 참모자반 효소분해산물 제조

효소추출법은 Heo 등 [16]의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 조효소액 8 mL (1.7 mg protein/mL)에 참모자반 분말 (0.5%)을 첨가하여 37°C 5일 동안 water bath에서 반응시켰다. 참모자반 효소 분해산물의 생성량은 효소에 의해 생성된 galactose 양을 DNS법 [21]에 따라 환원당을 측정하여 최적 참모자반분해 조건을 조사하였다. 생성된 참모자반 효소분해산물은 원심분리하여 상등액을 농축 (2.0 mg/mL)한 후 동결 건조시켜 -70°C에 보관하면서 생리활성 측정을 위한 시료로 사용하였다. 대조구 실험은 TE buffer에 참모자반 분말을 첨가하여 동일한 조건 하에서 반응시킨 후 대조구로 사용하였다.

2.5. DPPH radical 소거능 측정

참모자반 효소분해산물의 전자공여능은 Blois의 방법 [22]을 약간 변형하여 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 96-well plate에 시료와 0.4 mM DPPH용액을 1:4 비율로 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, ELISA reader (Molecular Device, Versa Max Microplate Reader, California, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능 (Electron donating ability, EDA)은 $EDA (\%) = (\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}) / \text{대조구 흡광도} \times 100$ 으로 계산하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 free radical의 제거활성을 백분율로 나타내었다.

2.6. Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

SOD 활성은 SOD assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, USA)를 사용하여 manufacturer's instruction에 기술된 방법에 따라서 수행하였다. 시료를 농도별로 희석하여 96-well plate에 20 μ L씩 분주한 다음 WST working solution을 200 μ L을 넣고 혼합한 후 효소반응용액을 20 μ L을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구 실험은 효소 대신 20 μ L dilution buffer를 넣고 수행하였다. SOD 활성은 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$SOD \text{ activity } (\%) = (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{시료 무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

2.7. 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Gray와 Dugan의 방법 [23]을 변형하여 측정하였다. 1 mM NaNO₂ 용액에 시료 용액을 가한 후 0.1 N HCl 및 0.2 M citrate buffer를 사용하여 반응용액의 pH를 각

각 1.2, 3.0 및 6.0으로 조정하였다. 이 반응용액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 각 반응용액 1 mL를 취하여 2% acetic acid 5 mL과 Griess 시약 0.4 mL를 가하여 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 NaNO_2 를 구하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 mL 가하여 상기와 동일하게 수행하였으며, 아질산염 소거능은 시료 첨가 전 후에 잔존하는 NaNO_2 의 백분율로 나타내었다.

$$\text{아질산염 소거율 (\%)} = [1 - (A - C) / B] \times 100$$

- A : 1 mM NaNO_2 용액에 추출 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도
 B : NaNO_2 용액의 흡광도
 C : 추출시료 자체의 흡광도

2.8. Alcohol dehydrogenase (ADH) 활성 측정

ADH 효소활성 측정은 Choi 등 [24]과 Racker [25]의 방법을 변형하여 수행하였으며, 생성된 NADH의 양을 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험관에 alcohol 0.1 mL, NAD 수용액 (2 mg/mL) 0.5 mL 및 시료 0.1 mL를 첨가하고 10 mM glycine-NaOH buffer (pH 8.8)를 총 부피가 1.8 mL가 되게 첨가 한 후 25°C 항온수조에서 10분간 반응시키고 ADH (10 unit/mL, Sigma)를 가하여 340 nm에서 spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.)를 이용하여 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 대조구는 시료대신 증류수를 첨가하였으며, positive control로 사용한 hepos는 약국에서 구입하여 처방전에 따라 1/2로 희석하여 사용하였다. ADH의 활성은 다음과 같은 식으로 상대적인 백분율로 계산하였다.

$$\text{ADH activity (\%)} = (\text{실험구의 최대 흡광도} / \text{대조구의 최대 흡광도}) \times 100$$

2.9. Acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성 측정

ALDH의 효소활성측정은 Koivula와 Koivusalo의 방법 [26]을 약간 변형하여 측정하였다. 반응용액은 증류수 2.1 mL에 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.3 mL, 20 mM NAD^+ 0.1 mL, 0.1 M acetaldehyde 0.1 mL, 3.0 M KCl 0.1 mL, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1 mL 및 시료 0.1 mL를 혼합한 다음 25°C에서 10분간 반응시킨 후 0.1 mL ALDH (1 unit/mL)를 첨가하여 반응용액이 3.0 mL이 되도록 조절하여 25°C 항온조에서 5분간 반응한 후 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료대신 TE buffer (pH 8.0)를 첨가하여 상대 활성 (%)으로 나타내었고, positive control과 활성 측정은 ADH 활성 측정식과 동일한 식을 사용하였다.

2.10. α -Glucosidase 활성억제 효과 측정

모자반 효소분해산물의 α -glucosidase 활성억제 효과 측정은 Tibbot와 Skadsen의 방법 [27]에 따라 측정하였다. 기질용액

은 50 mM sodium succinate buffer (pH 4.2)에 p -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG, Sigma)를 용해시켜 1 mg/mL의 농도로 조제하였다. 반응용액은 기질용액 0.2 mL과 효소액 (0.075 unit/mL, Sigma)을 혼합하고 대조구에는 증류수 0.1 mL, 반응구에는 시료 0.1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N-NaOH 0.1 mL를 첨가하여 발색시켰다. Positive control로는 acarbose를 사용하였으며, α -glucosidase 효소활성 측정은 생성된 p -nitrophenol (PNP)양을 400 nm에서 흡광도를 측정하여 다음의 식으로 저해율을 나타내었다.

$$\text{저해율 (\%)} = [1 - (\text{반응구의 } p\text{-nitrophenyl 생성량} / \text{대조구의 } p\text{-nitrophenol 생성량})] \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 참모자반 효소분해 산물

해조류로부터 유용물질을 효율적으로 처리하기 위하여 미생물의 효소를 이용하여 해조류를 가수분해 시키기 위한 연구는 많은 연구자들에 의해서 이루어졌으나 아직 해조류를 효과적으로 가수분해 시키는 방법은 확립되지 않았다. 이러한 해조류에 함유되어 있는 알긴산을 비롯한 여러 비소화성 다당류와 유용성분을 추출하기 위해서는 해조류의 세포벽을 분해할 수 있는 방법을 개발해야 한다.

최근 해조류를 분해하는 미생물들의 특성연구 [17]는 수행되고 있으나 해조류 분해에 이용된 보고는 거의 없는 실정이며, 효소를 이용하여 수행된 대부분의 연구들은 상업적으로 시판되고 있는 효소를 이용하여 가수분해 산물의 활성을 연구하고 있다 [15,16,18]. 본 연구에서는 해양으로부터 분리된 *Microbulbifer* sp. SC092 균주가 생산하는 polysaccharide-degrading 효소를 이용하여 [19] 참모자반 효소분해산물의 항산능, 아질산염소거능, 알코올 분해능 및 항당뇨효과를 분석하였다.

알긴산 분해활성이 매우 높은 *Microbulbifer* sp. SC092 균주의 조효소를 이용하여 참모자반 분말 첨가 후 37°C 항온수조에서 진탕 배양하였으며 배양시간에 따라 DNS 환원당량 실험을 한 결과 5일 만에 최고농도 (2 mg/mL)를 얻을 수 있었다. 감태를 이용한 선행연구 [28]에서는 48시간 반응시켰으며, Kim과 Bae [29]는 해조류 분해산물 분해하는 미생물을 분리하기 위하여 1~4주 동안 생성되는 환원당을 정량하여 분석하였고, 시판 효소를 이용한 Heo 등 [16,18]의 연구에서는 12시간 반응시켜 효소분해산물의 생리활성을 분석하였다. 이러한 결과는 효소의 정제상태나 시료 조건에 따라서 배양 시간을 달리한 것으로 판단된다.

3.2. DPPH assay

항산화 활성 측정법은 안정한 DPPH 라디칼을 소거하는 항산화물질인 phenolic compound와 aromatic amine 화합물 등에 의해서 환원되는 성질을 이용하여 항산화물질을 검색하는데

많이 이용되고 있다 [30]. 참모자반 효소추출물과 천연항산화제인 vitamin C의 항산화 효과를 DPPH radical scavenging 활성으로 측정하였다(Fig. 1). 참모자반 효소분해산물의 항산화 활성은 2 mg/mL에서 61.9%로 천연항산화제인 vitamin C와 비교하면 다소 낮게 나타났지만 농도가 증가할수록 그 활성 또한 비례적으로 증가하고 있으므로 참모자반 효소추출물의 DPPH 라디칼 소거능에 대한 기대치가 높을 것으로 판단된다. 이는 Heo 등 [16]의 단백질 및 탄수화물 분해효소를 처리한 해조류 효소추출물의 free radical scavenging 활성분석에서도 확인 할 수 있는데 감태 (70%)와 기존의 항산화제보다는 그 활성이 높지 않지만 항산화능 소재로서 모자반의 효소적 추출물을 기대 할 수 있을 것으로 보고하고 있다. 또한, Heo 등 [18]의 보고에 의하면 큰잎모자반의 cellulase와 Neutrase 효소추출물의 분자량별 분획물 중 분자량 5~10 kDa에서 항산화기능이 다른 분자량 분획물보다 높게 나타났다고 보고하였다. Ko 등 [15]은 큰잎모자반 당분해 효소추출물에서는 cellulase 추출물이 92.42%로서 가장 높은 라디칼 소거 활성을 보고하였다. 이로써 해조류 효소추출물의 라디칼 소거능을 높게 평가할 수 있는데 이는 우리의 선행연구인 참모자반 메탄올 추출 분획물의 결과에서도 확인할 수 있었다. 즉, 참모자반 효소추출물의 라디칼 소거능이 기존의 추출법인 열수, 메탄올, 에탄올, hexan 추출분획물보다 2배정도 높음을 나타내고 있다 [31]. 이러한 결과들은 시료에 따라 적당한 추출법을 활용하여 항산화활성을 연구해야 함을 시사하고 있을 뿐만 아니라 해조류에 있어서는 효소적 추출법이 그 생리활성분석에 더욱 적당한 방법일 것으로 사료된다.

지금까지의 연구에 의하면 식물에 있어서 DPPH radical scavenging 활성이 polyphenol 함량에 의존하는 것으로 보고하였는데 해조류의 항산화기능 또한 polyphenol의 작용에 기인한 것으로 알려져 있다 [32-34]. 이 뿐만 아니라 해조류 항산화물질 추출연구에서 단일성분이 아닌 다양한 성분들이 항산화활성을 나타내는 것으로 보고하였는데 fucoxanthin, phlorotannin, 비타민 C와 E, 황산화 다당류와 그들의 분해물 (laminarin과 fucoidan), GABA, 그리고 분해산물인 저분자의 단백질등이 항산화 활성에 영향을 주고 있다 [35-37]. 이들 성

분들은 모두 높은 항산화능을 보유한 것으로 알려져 있으므로 해조류의 효소적 추출물이 새로운 항산화능 소재로서 매우 유용할 것으로 사료된다.

3.3. Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

세포의 호흡작용에 의해 생성되는 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)은 세포막에 작용하여 손상을 주거나 DNA 및 단백질에 영향을 주어 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다 [3]. Superoxide anions은 약한 산화제이지만 매우 유해한 radical을 만들 수 있어 산소독성의 가장 중요한 원인 중의 하나이며, *in vivo*에서 생성되는 첫 번째 oxygen radical로서 다른 라디칼보다 더 오래 동안 지속된다. 세포질이나 미토콘드리아에 존재하는 SOD는 superoxide를 과산화수소와 산소분자로 전환시켜주는 반응을 촉매하여 활성산소로부터 세포를 방어하는 중요한 효소 중의 하나다. 참모자반 효소분해산물의 SOD 활성은 농도 의존적으로 증가하였으며, 2 mg/mL에서 82.9%로 높은 활성을 나타내고 있다 (Fig. 2).

Heo 등 [18]은 갈조류 효소추출물에서 superoxide radical scavenging 활성을 측정하였는데 *Ecklonia cava* 탄수화물 분해산물에서 68%의 scavenging 활성을 보였으며 갈조류의 SOD 활성은 분해효소에 따라 상당한 차이를 나타냈다. Kim 등 [3]은 경단구슬모자반으로부터 분리한 sulfated polysaccharide의 SOD활성이 10 mg/mL 농도에서 30%의 활성을 나타내었다. 기존의 추출법에 의한 참모자반 용매 분획물의 SOD활성분석에 의하면 참모자반 methanol, 부탄올, 물, hexan 분획층에서 각각 79.9%, 44.0%, 26.8%, 16.0%의 SOD 활성을 나타내었다 [31]. 대부분의 해조류 추출물연구에서 SOD 활성은 주로 용매추출물에 대한 결과로서 SOD 유사활성으로 측정하였는데 이러한 실험의 문제점은 수율이 낮고, 추출 시 고온을 이용하기 때문에 열에 불안정한 항산화 물질이 파괴되었을 가능성이 높은 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 수행한 polysaccharide-degrading 효소추출법에서 기존의 추출법을 활용한 연구결과보다 높은 활성을 나타내고 있어 해조류의 superoxide radical scavenging 활성을 측정을 위한 추출법으로 매우 유용할 것으로 판단된다.

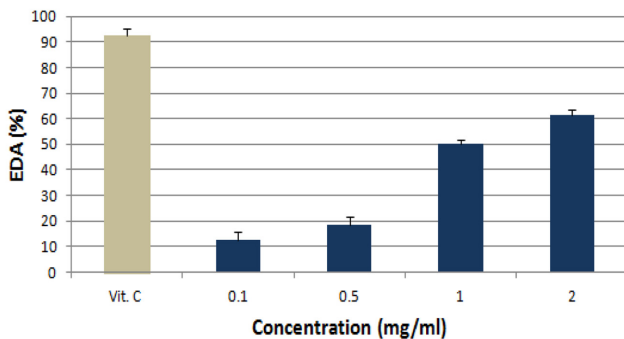


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activities of enzymatic extracts of *S. fulvellum*. Results are mean±S.D. of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 1 mg/mL) is used as positive control.

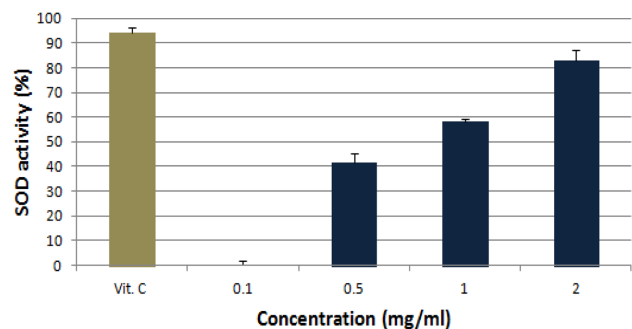


Fig. 2. SOD activity of enzymatic extracts of *S. fulvellum*. Results are mean±S.D. of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 1 mg/mL) is used as positive control.

3.4. 아질산염 소거능 측정

아질산염은 생선이나 육류 등에 발생, 풍미증진, 항균작용 및 산패방지를 위해 첨가제로 많이 이용되고 있으며, 식품 중의 질산염은 식물체내 소화기관 및 식품의 저장과정에서 질산 환원효소, 환원세균 등의 작용에 의해 아질산염으로 환원된다. 이러한 아질산염은 단백질 식품이나 의약품 및 잔류 농약 등에 존재하는 2급, 3급 등의 아민류와 반응하여 nitrosamine을 생성하며, 인체의 위 내에서 발암성 물질로 작용한다. 따라서 nitrosamine의 생성을 억제작용을 하는 물질들을 탐색하기 위한 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 참모자반 효소분해산물이 아질산염 소거능에 미치는 영향을 농도 1 mg/mL에서 pH별로 분석하였다. 그 결과 pH가 낮을수록 positive control인 vitamin C와 모자반 분해산물의 아질산염 소거능이 증가하였다 (Fig. 3). 즉, pH 1.2의 경우 52.5%로 최고 높은 아질산염 소거능을 보였고 pH 3.0과 pH 6.0에서는 각각 32.3%, 12.8%로 나타났다. 기존의 추출법에 의한 참모자반 용매 분획물의 아질산염 소거능분석에 의하면 pH 1.2에서 부탄올 분획층이 57.8%로 아질산염 소거능이 가장 높았고, pH 3.0과 6.0에서도 부탄올 분획층이 다른 분획층보다 아질산염 소거능이 높았다. 그 다음은 pH 1.2에서 메탄올 분획층 (41.5%), 핵산 분획층 (35.7%), 수층 (22.4%)의 순으로 나타났다 [31]. 이들 결과와 본 연구결과를 비교해 볼 때 참모자반 용매 분획물과 효소분해산물로부터의 아질산염 소거능에 대한 효과에서는 유의적인 차이를 나타내지 않음을 알 수 있다. 또한, Choi 등 [34]과 Park 등 [38]의 연구와 비교 분석한 결과에서도 유기용매 추출, 물 추출, 가수분해산물, 효소분해산물 간에 큰 차이를 나타내지 않아 추출조건에 따른 차이는 없는 것으로 사료된다. 다만, 인체의 위 내 pH 조건과 비슷한 pH 1.2에서 높은 활성이 나타나고 있어 우수한 기능성 소재로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

3.5. 알코올 분해 활성 (ADH, ALDH) 측정

참모자반 분해산물에 의한 숙취 해소능을 분석하기 위해서 체내 알코올대사 1차 효소인 ADH의 활성 및 acetaldehyde의

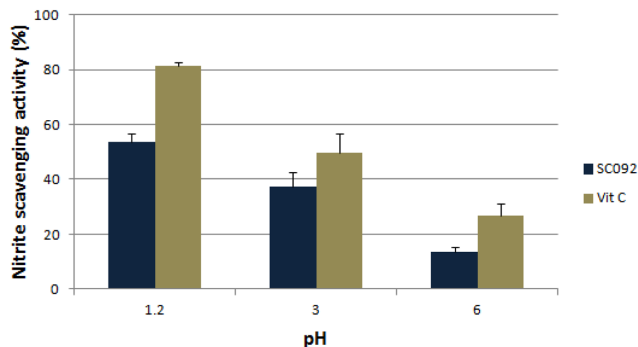


Fig. 3. Nitrite scavenging effect of enzymatic extracts of *S. fulvellum* (SC092) under different pH conditions. Results are mean±S.D. of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 1 mg/mL) is used as positive control.

분해하는 ALDH의 활성에 대한 참모자반 효소분해산물이 미치는 영향을 분석하였다 (Fig. 4A, B). 알코올 분해와 숙취에 효과가 있는 것으로 알려진 hepos를 대조구 (positive control)로 하여 분석한 결과 참모자반 효소분해산물의 ADH activity는 2 mg/mL 농도에서 약 118% 정도로 대조구에 비해 다소 낮게 나타났지만 ALDH의 활성은 같은 농도에서 175.6%로 대조구인 hepos보다 약 14%정도 더 높게 나타났으며, 농도 의존적으로 증가하였다. 이러한 결과는 참모자반 효소분해산물이 acetaldehyde를 acetic acid로 신속히 분해시켜서 숙취해소에 상당한 효과가 있을 것으로 기대된다. 일반적으로 해조류는 숙취해소에 효과가 있는 것으로 알려져 있지만 해조류에서 알코올 분해활성을 조사한 연구는 거의 없으며, 숙취해소에 대한 연구도 주로 유기용매 추출물로 수행되었으며 알코올 분해능에 대한 활성도 매우 높은 농도에서 있는 것으로 보고되고 있다 [10,31]. 특히, Kang 등 [31]의 보고에 의하면 기존의 추출법에 의한 참모자반 용매 분획물의 알코올 분해효소에 대한 ADH activity를 측정된 결과 메탄올 분획층에서 농도 5 mg/mL인 경우 120.3%, 10 mg/mL인 경우 177.0%로 나타났다. 10 mg/mL 농도에서 부탄올층이 143.8%, 수층이 139.8%, 핵산층이 129.3%로 나타났다. 참모자반 용매 분획물에 대한 ALDH 활성은 다른 용매 분획물에서보다 메탄올 분획물에서 높게 나타났는데 10 mg/mL 농도에서 167.4%로 나타났다. 따라서, 효소추출법에 의한 생리활성 연구가 기존의 유기용매 및 열수 추출법보다도 해조류의 숙취해소능을 연구하는데 더욱 효과적인 방법인 것으로 생각된다.

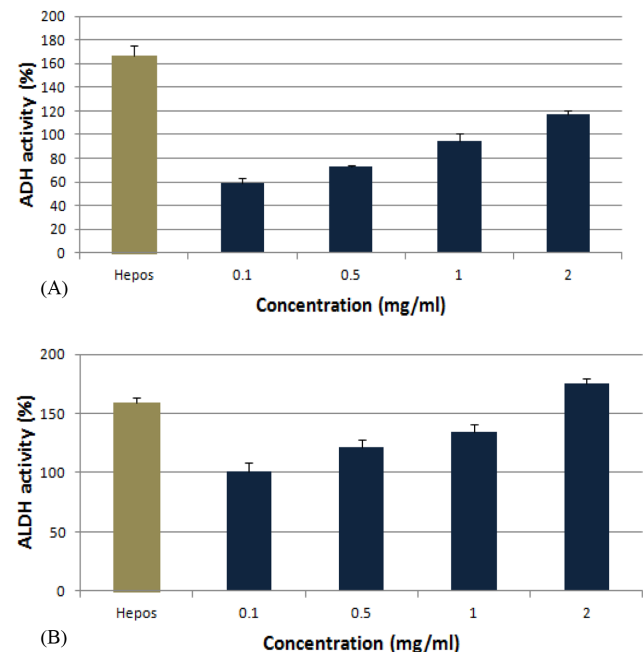


Fig. 4. Effects of enzymatic extracts of *S. fulvellum* on the alcohol dehydrogenase (ADH) [A] and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity [B]. Results are mean±S.D. of triplicate data. Hepos (50%) is used as positive control.

3.6. α -Glucosidase 활성억제 효과

최근 많은 연구자들이 해조류로부터 당뇨병 및 합병증에 유효한 새로운 소재를 탐색하고 있으며, 특히 갈조류 중에서도 모자반류에서 항산화 및 항당뇨 효과가 높은 것으로 보고되고 있다 [31,39]. 당뇨병치료제를 개발하기 위한 작용기전에 대한 연구는 탄수화물의 소화 및 흡수억제, 췌장세포의 insulin 분비촉진, 간에서의 탄수화물대사조절 및 포도당에 대한 인슐린 sensitivity 등을 개선하기위한 연구가 수행되고 있다 [40]. α -Glucosidase는 α -amylase에 의해 분해된 당질을 최종적으로 단당류로 전환시키는 효소로 이러한 효소의 활성 저해는 당질 가수분해와 흡수를 지연시켜, 식후 혈당증가를 개선하게 된다 [41]. 이러한 α -glucosidase활성 억제제는 소장에서의 탄수화물 소화흡수를 저해함으로써 인슐린 비의존성 당뇨병의 고혈당으로 인한 고인슐린혈증을 개선하는 효과를 나타내게 된다. 따라서, 본 연구에서도 참모자반의 효소분해 산물로부터 항당뇨 활성을 분석하기 위하여 α -glucosidase 억제활성을 측정하였다 (Fig. 5). 본 연구에서 대조구로 사용된 acarbose (0.5 mg/mL)는 40.4%의 α -glucosidase 저해 활성을 보였고 참모자반 효소추출물은 농도 의존적으로 증가하였으며, 2 mg/mL 농도에서 52.7%의 저해효과를 나타냈다. 기존의 추출법으로 연구한 Kang 등 [31]의 연구에서는 4개의 용매 분획물 중 핵산 분획층에서 α -glucosidase 활성이 농도의존적으로 현저하게 감소하는 것으로 나타났으며, 핵산층 2 mg/mL 농도에서 94.1%의 항당뇨 효과를 나타내었다. 그런데 부탄올층, 메탄올층, 수층은 항당뇨 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 본 연구결과와 비교해 볼 때 참모자반 용매 추출 분획물에 대한 활성보다 효소추출물이 다소 낮은 α -glucosidase 저해활성의 효과를 나타내고 있어 항당뇨 생리활성 물질 추출법은 유기용매 추출법이 더 효과적인 것으로 생각된다. 해조류의 기능성에 대한 연구는 주로 유기용매 추출법을 이용하여 수행되어 왔으나, 최근 Heo와 Jeon [16]은 해조류의 효소적 분해산물로의 항산화효과 및 세포손상억제효과를 보고하였으며, Kim 등 [17] 해양미생물 유래 해조다당류 분해효소의 특성 및 산업적응용에 대하여 보고하였다.

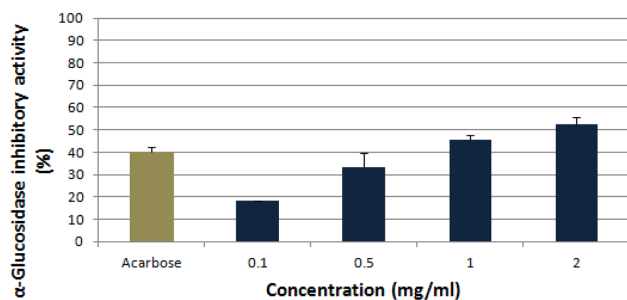


Fig. 5. Inhibitory effects of enzymatic extracts of *S. fulvellum* on α -glucosidase. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Acarbose (0.5 mg/mL) is used as positive control.

4. 결론

해양으로부터 polysaccharide degrading enzyme 생산하는 균주를 이용하여 참모자반분말 효소분해산물의 생리활성을 분석하였다. 참모자반 효소분해산물의 항산화 활성은 DPPH radical 소거능과 SOD 활성을 측정하였다. DPPH radical 소거능과 SOD 활성은 2 mg/mL 농도에서 각각 61.9%와 82.9%로 나타났다.

항염증효과를 나타내는 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 약 52.5%의 아질산염 소거능을 나타냈으며, 알코올을 분해하는 ADH 및 ALDH의 효소활성은 2 mg/mL 농도에서 118.0%와 177% 나타났었다. 특히 숙취의 주 원인물질인 acetaldehyde를 감소시키는 ALDH 활성 능력은 positive control로 사용한 50% hepos (156.0%)보다 높은 활성을 나타냈다. 제 2형 당뇨병 억제와 연관이 있는 α -glucosidase 활성억제 효과는 2 mg/mL 농도에서 52.7%의 혈당강하 효과를 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 효소추출법이 새로운 기능성 소재를 탐색하기 위한 효과적인 추출법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Kim, S. Y., H. G. Nam, H. J. Shin, M. S. Na, M. H. Kim, C. W. Lee, J. S. Kim, Y. L. Piao, and W. S. Cha (2011) Effect of hot water extract of *Undaria pinnatifida* on the activities of antioxidant and nitrite scavenging. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 26: 151-156.
- Kim, J. Y., J. A. Lee, K. N. Kim, W. J. Yoon, W. J. Lee, and S. Y. Park (2007) Antioxidative and antimicrobial activities of *Sargassum muticum* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutrition* 36: 663-669.
- Kim, S. H., D. S. Choi, Y. Athukorala, Y. J. Jeon, M. Senevirathne, and C. K. Rha (2007) Antioxidant activity of sulfated polysaccharides isolated from *Sargassum fulvellum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutrition* 12: 65-73.
- Kwak, S. C., S. A. Kim, and M. S. Lee (2005) The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutrition* 34: 1143-1150.
- Yoon, S. Y., S. Y. Lee, K. B. Kim, W. R. Song, E. J. Kim, S. J. Lee, C. J. Lee, N. B. Park, N. B., J. Y. Jung, J. H. Kwak, K. W. Nam, and D. H. Ahn (2010) Antimicrobial activity of the *Sargassum fulvellum* ethanol extract and the effect of temperature and pH on their activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 155-159.
- Choi, S. J., S. M. Lee, and J. W. Lee (2012) Production of bio-ethanol from red algae by acid hydrolysis and enzyme treatment. *Appl. Chem. Eng.* 23: 279-283.
- Park, E. Y., S. M. Jeong, Y. J. Kim, and D. H. Lee (2012) Review on hydrolysis methods of the macroalgae for production of bioethanol. *Korean Soc. Waste Management* 29: 323-333.
- Yanagisawa, M., K. Nakamura, O. Ariga, and K. Nakasaki (2011) Production of high concentrations of bioethanol from seaweed that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochem.* 46: 2111-2116.

9. Koo, J. G., Y. S. Choi, and J. K. Kwak (2001) Blood-anticoagulant activity of fucoidans from sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea. *J. Korean Fisheries Soc.* 34: 515-520.
10. Cho, S. H., S. E. Kang, J. Y. Cho, A. R. Kim, S. M. Park, Y. K. Hong, and D. H. Ahn (2007) The antioxidant properties of brown seaweed (*Sargassum siliquastrum*) extracts. *J. Med. Foo.* 10: 479-485.
11. Hwang, P. A., S. Y. Chien, Y. L. Chan, M. K. Lu, C. H. Wu, Z. L. Kong, and C. J. Wu (2001) Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphylum* sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Agricultural and Food Chem.* 59: 2062-2068.
12. Kim, S. N., H. Y. Choi, W. Lee, G. M. Park, W. S. Shin, and Y. K. Kim (2008) Sargaquinolic acid and sargahydroquinolic acid from *Sargassum yezoense* stimulate adipocyte differentiation through PPAR alpha/gamma activation in 3T3-L1 cells. *FEBS Lett.* 582: 3465-3472.
13. Mori, J., M. Iwashima, H. Wakasuki, H. Saito, and T. Matsunaga (2005) New plastoquinones isolated from the brown alga, *Sargassum micracanthum*. *Chem. Pharmaceutical Bull.* 53: 1159-1163.
14. Heu, M. S., M. S. Yoon, H. J. Kim, K. W. Park, J. H. Lee, M. R. Jo, J. S. Lee, Y. J. Jeon, and J. S. Kim (2010) Improvement on the antioxidant activity of instant noodles containing enzymatic extracts from *Ecklonia cava* and its quality characterization. *Korean J. Fisheries and Aquatic Sci.* 43: 391-399.
15. Ko, S. C., S. M. Kang, G. Ahn, H. P. Yang, K. N. Kim, and Y. J. Jeon (2010) Antioxidant activity of enzymatic extracts from *Sargassum coreanum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutrition* 39: 494-499.
16. Heo, S. J. and Y. J. Jeon (2005) Antioxidant effect and protecting effect against cell damage by enzymatic hydrolysates from marine algae. *Food Ind. Nutrition* 10: 31-41.
17. Kim, J. H., Y. H. Kim, S. K. Kim, B. W. Kim, and S. W. Nam (2011) Properties and industrial application of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganism. *J. Microbiol. Biotechnol.* 39: 189-199.
18. Heo, S. J., E. J. Park, K. W. Lee, and Y. J. Jeon (2005) Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Biores. Technol.* 96: 1613-1623.
19. Song, H. J. (2009) Molecular cloning and characterization of agarase gene from marine bacterium, *Microbulbifer sp.* AJ-3. M.S. Thesis, Silla University, Busan, Korea.
20. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
21. Kim, J. A. and J. M. Lee. (2004) The changes of biologically functional compounds and antioxidant activities in *Ecklonia cava* with blanching times. *J. Korean Soc. Food Culture* 19: 369-377.
22. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Natur.* 26: 1198-1200.
23. Gray, J. I. and Jr L. R. Dugan (1975) Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40: 981-984.
24. Choi, J. T., H. K. Joo, and S. K. Lee (1995) The effect of *Schizandra fructus* extract on alcohol fermentation and enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural Chem. Biotechnol.* 38: 278-282.
25. Racker, E. (1973) Alcohol dehydrogenase in rat liver. *J. Biochem.* 135: 577-581.
26. Koivula, T. and M. Koivusalo (1975) Different from of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochimica et Biophysica Acta.* 397: 9-23.
27. Tibbot, B. K. and R. W. Skadsen (1996) Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from berley. *Plant Mol. Biol.* 30: 229-241.
28. Kim, H. Y., E. K. Cho, S. H. Kang, J. M. Bae, and Y. J. Choi (2012) α -Glucosidase, tyrosinase, and elastase inhibitory effects of enzymatic extracts from *Ecklonia cava* and its alcohol metabolizing activity. *J. Life Sci.* 22: 751-759.
29. Kim, H. S. and T. J. Bae (2002) Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganism and its application. II. Screening of microfloras involved in hydrolysis of several tenella, seaweed fusiforms and green laver. *Korean J. Food Nutr.* 15: 257-266.
30. Matsukawa R, Z. Dubinsky, E. Kishimoto, K. Masaki, Y. Masuda, and T. Takeuchi (1997) A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 9: 29-35.
31. Kang, S. H., E. K. Cho, and Y. J. Choi (2012) α -Glucosidase inhibitory effects for solvent fractions from methanol extracts of *Sargassum fulvellum* and its antioxidant and alcohol metabolizing activities. *J. Life Sci.* 22: 1420-1427.
32. Lee, S. O., H. J. Lee, M. H. Yu, H. G. Im, and I. S. Lee (2005) Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ulung Island. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 233-243.
33. Lee, B. H., B. W. Choi, J. H. Chun, and B. S. Yu (1996) Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. *J. Ind. Eng. Chem.* 7: 1069-1077.
34. Choi, S. Y., S. Y. Kim, J. M. Hur, H. G. Choi, and N. J. Sung (2006) Antioxidant activity of solvent extracts from *Sargassum thunbergii*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutrition* 35: 139-144.
35. Nardella, A., F. Chaubet, C. Boisson-Vidal, C. Blondina, P. Durandb, and J. Jozefonvicza (1996) Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Res.* 289: 201-208.
36. Yan, X, Y. Chuda, M. Suzuki, and T. Nagata (1999) Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hizikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 605-607.
37. Burtin, P (2003) Nutritional Value of seaweeds. *Electronic J. Environ. Agricultural and Food Chem.* 2: 498-503.
38. Park, J. W., M. J. Lee, H. M. Yoon, and C. H. Kim (2001) Nitrite scavenging activity of the ethanol and water extracts obtained from *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum*. *J. Life Sci.* 11: 321-327.
39. Lee, E. H., J. Han, H. R. Ahn, M. C. Kim, C. Y. Kim, C. H. Pan, B. H. Um, and S. H. Jung (2009) Inhibitory effects of the compounds isolated from *Sargassum yezoense* on α -glucosidase and oxidative stress. *Korean J. Pharmacognosy* 40: 150-154.
40. Moller, D. E. (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414: 821-827.
41. Shind, J., T. Tabldone, M. Barletta, N. Kunaparaju, B. Hu, S. Kumar, J. Placido, and Z. S. William (2008) α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn). Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydrate Res.* 343: 1278-1281.